

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-307139

(43)Date of publication of application : 17.11.1998

(51)Int.CI. G01N 33/543
G01N 33/553

(21)Application number : 10-103121 (71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22)Date of filing : 14.04.1998 (72)Inventor : SLUKA PETER DR

KNOLL WOLFGANG
ZIZLSPERGER MANFRED

(30)Priority

Priority number : 97 19715484 Priority date : 14.04.1997 Priority country : DE

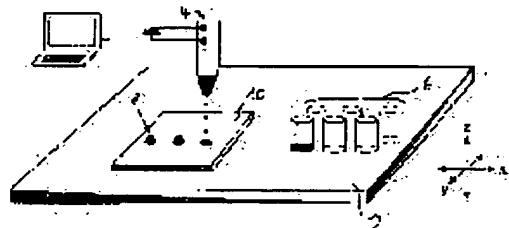
(54) METHOD FOR FORMING REAGENT SPOT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To form the array structure of a reagent spot easily by allowing a combined reagent to contact, for a sufficient amount of time, the solid

phase region of metal and oxidation metal so that their adsorption combination type formation can be formed.

SOLUTION: A gold layer that is approximately 50 nm thick is deposited in a high vacuum on a glass support 10, the support 10 is fixed on an XYZ table 2 with a pump 4 immediately after the deposition, and a micro-liter plate 6 is mounted to a working surface. To form a reagent spot on a metal surface, the tip of the pump 4 is dipped into a corresponding liquid and a liquid drip 8 with a capacity of approximately 1 nl is placed at a specific position on the surface. After the pump 4 is washed for two times in a pure solvent, the liquid drip 8 of a next solution is placed at a next specific spot and the process is repeated successively as needed. Then, a gold surface where the reagent spot is placed is hardened for approximately 10 minutes. In the meantime, self-assembled single layer is formed on a surface that is covered with the liquid drip 8. A non-adsorption



molecule is washed in a pure solvent, thus quickly manufacturing a surface with a reaction spot being demarcated spatially.

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the solid phase coupling matrix which contains various solid-phase-reaction things and/or the solid-phase-reaction thing of various concentration in the method of forming the reagent region or reagent spot demarcated spatially on the solid phase which has the surface of metal or metal oxide, and the reagent spot demarcated spatially.

[0002]

[Description of the Prior Art] Many methods of using it for adding a small amount of reagents on the various surfaces, such as glass or plastic support, are known. By such a method, the fine structure of a reagent is acquired on the surface, for example as a gestalt of the reagent spot separated spatially mutually. That it is interesting, especially concerning this point is the fine structure-sized surface (what is called the array (array)) where each reagent spot contains the reactant from which each reagent spot has different functionality, for example, a DNA fragment, an antibody, etc. differ. WO92/10 The method of using it for making the structure where plurality changes on a glass support body with use of a photoactive compound and exposures which use a mask form in 092 is indicated. in U.S. Pat. No. 4,877,745, the method of laying the spot which boiled many things and was organic-functions-sized in plastic support by an ink jet is indicated.

[0003]Unlike the surface of a plastic, the surface of metal and metal oxide has the advantage that the matrix layer strictly demarcated by the self-assembly method can be coated. For example, if an organic alkyl thiol is made to adsorb on the golden surface, the monolayer (SAM) which carried out the self-assembly will be formed. Such voluntary association-ization of the monolayer with which it filled up with high density is due to the powerful specific mutual action of a support material and adsorbent (Nuzzo and others, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983)

4481). Thus, it is possible to lay the monolayer by which the coupling matrix was demarcated strictly on the surface of metal (for example, gold or silver). EP-A-0 515 The specific binding ability of the solid phase which carried out the self-assembly can be further optimized by dilution of a specific solid-phase-reaction thing to 615 as a statement.

[0004]It is also publicly known to coat a surface of metal with the fine structure based on the monolayer which carried out the self-assembly. For example, Whitesides and others (Langmuir 10 (1994) 1498-1511) has indicated how to carry out the stamp of the reagent on the precious-metals surface using the special silicone stamp for fine-structure-izing. It becomes possible to make the monolayer of the fine structure which has by this the zone separated spatially mutually form. However, in such a Stamping method, each zones of all acquired will be organic-functions-ized equally. that is, like [in the case of array structure], can boil various each spots, they cannot be coated with this method, and various functionality cannot be acquired by it.

[0005]It is publicly known that all the fields can form the fine structure of the monolayer which carried out the self-assembly on the precious-metals surface by the exposure using the mask of the base covered with the thiol and washing following it (Hemminger and others, Langmuir 10 (1994), 626-628). The zone which is organic-functions-ized equally altogether and which was separated spatially is also formed by this method. Furthermore it obtains reagent spot, the spot of the gold separated spatially mutually first is made to form on a base material as another possibility, and coating a reagent subsequently to this spot is mentioned. However, in order for manufacture of such a golden spot separated spatially to take a long time and to form this spot, it is necessary to vapor-deposit this base using a mask. In order to coat a golden spot with a reagent, for example using a micropipette following it, very precise handling is required, in the case of the structure of the range of mum, such handling is dramatically difficult to realize, and it is very complicated technically to it.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, the technical problem of this invention is providing the method of forming the array structure of reagent spot in the surface of metal or metal oxide simple.

conquered by spotting a reagent for self-assemblies in one solution on a surprising thing directly on a reagent base material which covered metal or metal oxide to the whole.

[0009]

[Embodiment of the Invention] For example, reagent spot can be made to form using the ink jet method or an automatic micro pipetting device. this method -- a reagent solution -- the gestalt of a small drop -- it applies to the surface with the gestalt of a minute drop preferably. After applying a reagent solution, this surface is preferably incubated for 5 to 10 minutes, for example for 1 to 60 minutes a certain amount of time so that formation of adsorption combination may be attained between the surfaces of a joint reagent, metal, or metal oxide. Although incubation time changes with the joint reagents and the surfaces to be used, let it be sufficient length to enable formation of adsorption combination. The joint reagent monolayer which carried out the self-assembly is made to form with the gestalt of the field demarcated spatially on the surface of metal or metal oxide in this method. In order to prevent contamination (smearing) of adjacent zones, a solvent with a superfluous size washes this surface promptly after an incubation. According to the joint reagent to be used, aquosity and/or an organic solvent can be used as a solvent.

[0010]By applying the reagent combined with a surprising thing in adsorption to the layer of continuous metal or metal oxide, it is possible to make the field demarcated spatially form with the gestalt of a spot, and while having applied in this case, significant contamination of an adjacent spot does not arise after that. In order that an adsorption joint reagent may stand it still to a surprising thing, the separated spot is formed in spite of the mere adsorption combination with the surface and a joint reagent. The important advantage of this method, For example, it is being able to make the surface area which has various coating or the functionality which can be used by the multipara meter (multiparameter) assay in detecting methods, such as immunological assay or nucleic-acid-hybridization assay, form. When performing the washing process after completion of a self-assembly, it became clear that a joint reagent was not carried in other reagent spot on a base material. It was maintained to the same part that the zone demarcated spatially [each] is stable after manufacture of the organic-functions-ized surface again, i.e., the adsorbed joint reagent, and it became clear that it did not move to the part as for which metal or the metal oxide surface is vacant.

[0011]The field of the reagent spot formed has a diameter of 1 mm or less still more preferably 5 mm or less preferably. Reagent spot is most preferably formed in the range of the micrometer, for example, has a diameter of 50-500 micrometers. This is equivalent to the dropping fluid capacity abbreviation 0.1 of a reagent solution - 10nl. Since the spot demarcated clearly spatially is formed by this invention method, it is possible to acquire microarray (microarray) structure. A different reactant for immunoassay or a nucleic-acid-hybridization examination and/or a different reactant of concentration can be applied to each of each spot

zone, for example.

[0012]the surface -- desirable -- the surface of the precious metals -- especially -- desirable -- the surface of gold or silver -- it is the golden surface most preferably. Such a surface of metal can be made to form by, for example, vapor-depositing a thin metal layer on a base material (for example, glass support body). The thickness of such a deposition layer is 10-100 nm preferably. When using the precious-metals surface, SH or SS reagent is preferably used as an adsorption joint reagent. Such a thiol and a disulfide reagent are DE 40, for example. 39 It is indicated in detail to 677. The compound containing a thiol or a disulfide group is especially used preferably as an adsorption joint reagent which contains further a combinable basis (for example, an antigen, hapten, or a biotin group) specifically. Subsequently the biotinylation thiol reagent adsorbed on the surface as SAM is coated with streptoavidin. In this case, if the biotin contents in a spot differ for every spot, a different streptoavidin layer will be obtained.

[0013]On the other hand, it is also possible to use metal oxide as the surface. As the surface of suitable metal oxide, SiO_2 , TiO_2 , $\text{aluminum}_2\text{O}_3$, Sn_2O_3 , Ag_2O , La_2O_3 , Ta_2O_5 , and those mixtures are mentioned, for example. The surface of the metal oxide which consists of SiO_2 and/or TiO_2 is used preferably. When using the surface of metal oxide, the compound containing the Silang group is preferably used as an adsorption joint reagent. Such a compound is EP-A-0, for example. 664 It is indicated to 452. In making the compound containing the Silang group stick to the metal oxide surface, after bridge construction of covalent bond nature adsorbing, it produces by heating, for example.

[0014]The adsorption joint reagent used by this invention preferably, Besides each adsorption group (for example, SH, SS, or the Silang group), specifically At least one combinable basis. (For example, biotin, the biotin derivative, streptoavidin, the hapten, antigen, and/or nucleic acid sequence which are specifically combined with binder phase hands, such as analyte which should be measured) are contained. Combination of the analyte to the solid phase matrix by which this invention was organic-functions-ized is detectable by parfocal scanner fluorescence microscopy or plasmon resonance spectroscopy, for example. A plasmon resonance microscopic inspection (B. Ruthenhausler and others, Nature, vol. 332 (1988) 615-617) performs this detection preferably. Combination of analyte can be detected by surface plasmon resonance, without using a marker reagent. Especially, preferably, in order to detect combination of analyte, plasmon resonance and fluorescence detection are measured simultaneously. In this case, since a plasmon resonance signal and the fluorescent signal of each other are obtained independently, in addition to high sensitivity (10^{-14} mol/l) being obtained, the measurement of chemical kinetics of them is also attained.

[0015]Another theme of this invention is a solid phase matrix containing the base material which coated the layer of metal or metal oxide continuously substantially, (b) The reagent

region spatially demarcated on the layer of this metal or metal oxide is arranged, and contain the solid-phase-reaction thing in which these reagent regions (a) Differ, and/or it is a solid phase matrix containing the solid-phase-reaction thing of different concentration. such a solid phase coupling matrix -- desirable -- at least three zones organic-functions-ized by differing -- at least five zones organic-functions-ized by differing are especially included on the surface preferably. The diameter of reagent spot is 500 micrometers or less 1 mm or less 5 mm or less preferably. Such a solid phase matrix that has the reagent spot of the range of mum may be called a microarray.

[0016]Another theme of this invention is the method of detecting combination and/or the interaction of analyte using the solid phase matrix of this invention. When using plasmon resonance spectroscopy and/or a plasmon resonance microscopic inspection as a detecting method, since it is measurable in layer thickness, detection of real time is possible, and the sign is unnecessary. This method can be used for nucleic acid hybridization in the molecular diagnostics for judging allergy, and immunology. In order to detect combination and/or the interaction of analyte, the combination of plasmon resonance spectroscopy and fluorescence detection or the combination of a plasmon resonance microscopic inspection and fluorescence detection is used especially preferably.

[0017]

[Example]Below, an example and an accompanying drawing explain this invention in more detail.

[0018]The principle of the method of formation this invention of the reagent spot in the example 1 surface is explained with reference to drawing 1 about a desirable embodiment. First, the layer of gold about 50 nm thick was made to vapor-deposit in a high vacuum (about 10^{-7} mbar) using a high vacuum coating device (Leibold Co.) on the glass support body which consists of LASFN9 high-refractive-index glass. The base material (10) was fixed on the XYZ table (Isel-EP 1090/4) (2) which equipped the silicon pressure pump (GeSIM, Dresden) (4) immediately after vacuum evaporation of the gold layer. The microtiter plate (6) was attached to the work plane of a XYZ table (2). This microtiter plate contains the various adsorption joint reagents and pure solvents which were dissolved in the solvent in each different well. As a substance for adsorption, the water-soluble thiol system which consists of HS-Prop-DADOO-X-biotin (combinable reagent) (drawing 2 a) and HS-C2-aminoethoxy ethanol (diluent ingredient) (drawing 2 b) is dissolved in water by the concentration of a 5×10^{-4} mol, The thiol system of fusibility was dissolved in the ethanol which consists of HS-C12-DADOO-biotin (combinable biotin component) (drawing 2 c) and mercaptoundecanol (diluent ingredient) (drawing 2 d) by the concentration of the 5×10^{-4} mol at ethanol. These systems were put into the separate well of a microtiter plate with the different mixture ratio (the ratios of a biotin component are 0%,

10%, 50%, and 100%). In order to make reagent spot form in a gold surface, dipped the tip of the pump (4) in the fluid, subsequently it was made to move to the position of the schedule on the surface which coated gold, and the drop (8) of the capacity of about 1 nl was laid in the position this time. Subsequently, the pure solvent washed the pump twice, this process was repeated with the following solution, and the following spot was laid in the position which separated about 600 micrometers from the pre- spot. This process is repeatable repeatedly if needed.

[0019] Subsequently, the gold surface in which reagent spot was laid was solidified for about 10 minutes. The monolayer which carried out the self-assembly between them was formed on the surface covered by this drop. Subsequently, in order to wash out a non-admolecule, the pure solvent washed the whole region of the gold surface. Thus, it is possible to manufacture the surface which has the reaction spot demarcated spatially for a short time. The diameter of the spot was about 200 micrometers.

[0020]In order to measure the optical thickness of the biotin monolayer by which plasmon microscopic inspection production of the reagent spot formed in example 2 gold surface was carried out and to investigate the binding characteristic over streptoavidin, The gold surface which has reagent spot was investigated by the Kretschmann configuration (it combined with prism) by the surface plasmon microscopic inspection. In this method, when the laser beam (red helium-Ne laser) (14) which p-polarized light was carried out with the polarizing plate (12), and was able to be extended passed along the prism (16) which consists of high refraction glass by a specific incidence angle to a metal layer (18), surface plasmon was excited, as shown in drawing 3. According to the incidence angle, catoptric light was recorded by the CCD camera (20). The structure shown in drawing 3 contained a goniometer (30) and two lenses (28, 32) which constitute microscope OPUCHIKKUSU. The contrast of the light and darkness on the recorded photograph changes with layer thickness on reagent spot. It is possible to measure an absolute increase and its time progress of layer thickness in the accuracy of about 0.1 nm using the image analysis system (22) containing a computer. Drawing 4 and 5 show the photograph obtained using the CCD camera of the spot with which before combination of streptoavidin and the back were coated by the thiol. various drawing 6 shows time progress of the intensity obtained by the image analysis of combination of streptoavidin to the spot boiled and coated. Although six photographs are shown in drawing 4, those each shows 12 thiol spots which it is equal in case the incidence angles of a laser beam differ, and were organic-functions-ized. Although the coated base material which has 16 reagent spot is shown in drawing 5, each 1-set four spot is equally organic-functions-ized in this case, a left-hand side photograph is taken before combination of streptoavidin, and a right-hand side photograph is taken after combination of streptoavidin. according to [passage clear from these] the method of this invention, it becomes possible to make the reagent spot organic-functions-ized by the

versatility separated spatially form in the continuation surface.

[0021] Drawing 6 shows time progress of adsorption of streptoavidin to the surface which coated four different hydrophilic thiol mixtures obtained by analyzing the reflectivity of a plasmon resonance microscopic inspection. K1 expresses the reagent spot which incubated with the pure solvent solution. Subsequently, this spot was processed by streptoavidin. Combination of streptoavidin to reagent spot is very slight as shown in drawing 6. K2 incubates with the solution which consists of 1% of biotinylation thiol, and 99% of diluent thiol, and expresses the reagent spot subsequently processed by streptoavidin. A streptoavidin combination fairly higher than the curve K1 can be accepted. K3 incubates with 100% of biotinylation thiol (with namely, those without a diluent molecule), and expresses the reagent spot subsequently processed by streptoavidin. Layer thickness was increasing considerably with 33**3 Å by K3 to having been 22**3 Å in K2. Finally, K4 expresses the reagent spot processed by 10% of biotinylation thiol, and 90% of diluent molecule. In this case, although the diluted uniform combining layer was formed, this showed the highest reflection after streptoavidin processing, and layer thickness was computed with 43**3 Å. The reagent spot which has various coating can be made to form in a single even golden base material, and, thereby, an array system is formed as shown in drawing 6. It is possible to detect combination and/or the interaction of analyte using such an array, and layer thickness (coating amount) and chemical kinetics (adsorption rate) can be measured in this case.

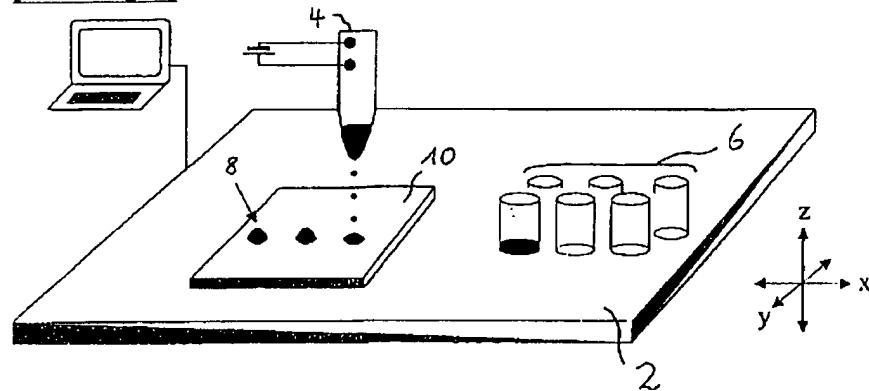
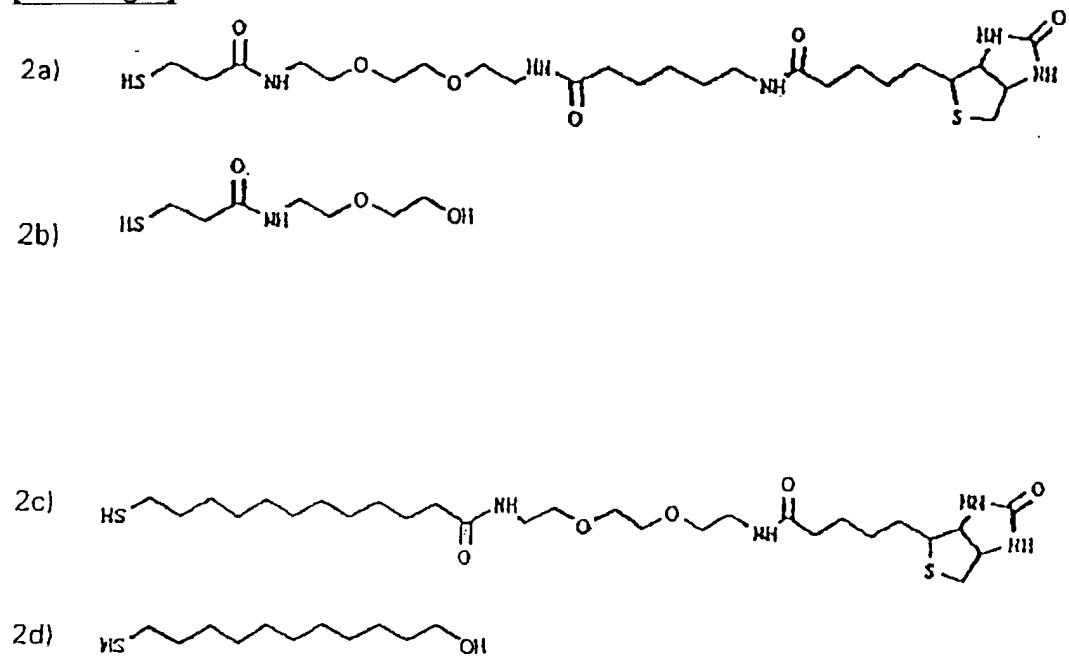
[Translation done.]

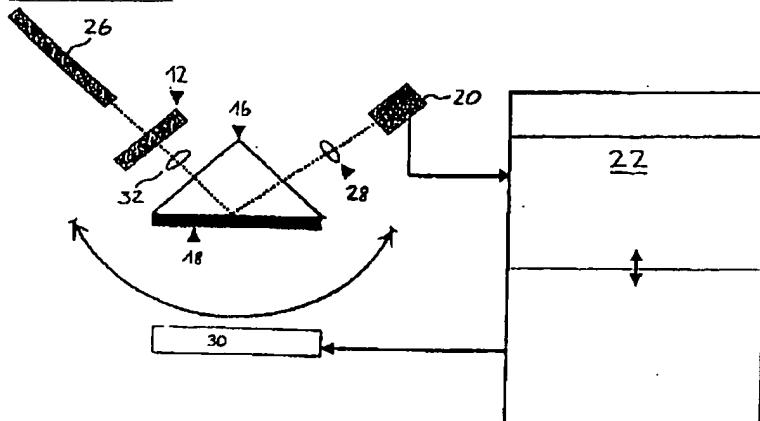
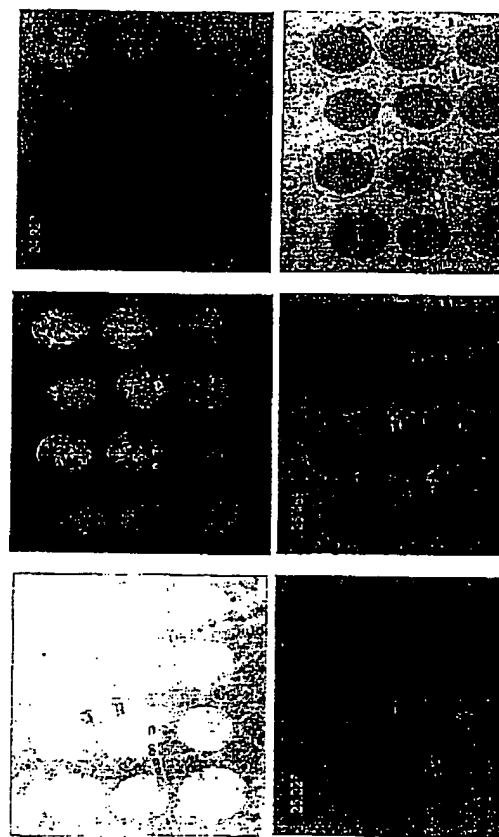
* NOTICES *

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

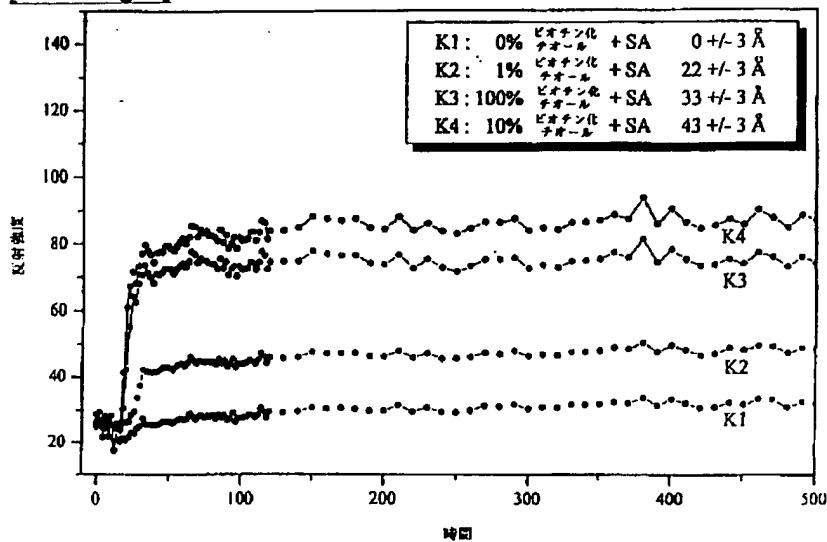
DRAWINGS

[Drawing 1]**[Drawing 2]**

[Drawing 3]**[Drawing 4]****[Drawing 5]**



[Drawing 6]



[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-307139

(43)公開日 平成10年(1998)11月17日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 33/543
33/553

識別記号
5 2 5

F I
G 0 1 N 33/543
33/553

5 2 5 G

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全7頁)

(21)出願番号 特願平10-103121

(22)出願日 平成10年(1998)4月14日

(31)優先権主張番号 197 15 484:0

(32)優先日 1997年4月14日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 594057093
ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国 68305 マンハイム-
ワルドホフ, サンドホファー シュトラーセ 112-132

(72)発明者 ピーター シュルカ
ドイツ連邦共和国 ディー-82362 ヴェ
イルハイム, セント-アンナーベク 17

(72)発明者 ウォルフガング クノール
ドイツ連邦共和国 ディー-55124 マイ
ンツ, ジャンシュトラーセ 43

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

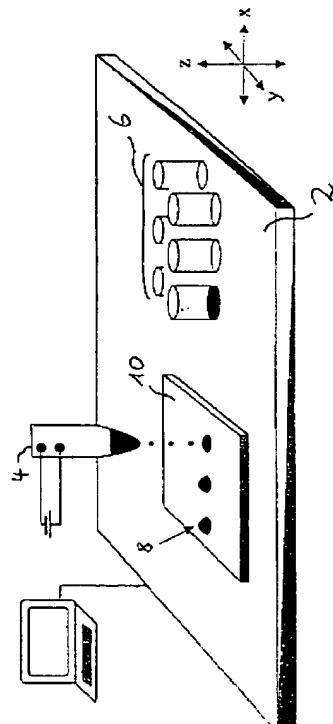
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試薬スポットの形成方法

(57)【要約】

【課題】 試薬スポットのアレイ構造を金属または酸化金属の表面に簡便に形成することができる方法の提供。

【解決手段】 空間的に画定された試薬領域を固相に形成する方法であって、吸着結合試薬を含有する液体と、実質的に連続的な金属または酸化金属の表面を含む空間的に画定された固相領域とを、該結合試薬と該固相との吸着結合の形成を可能にするのに十分な時間接触させることを特徴とする方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 空間的に画定された試薬領域を固相上に形成する方法であって、吸着結合試薬を含有する液体と、実質的に連続的な金属または酸化金属の表面を含む空間的に画定された固相領域とを、該結合試薬と該固相との吸着結合の形成を可能にするのに十分な時間接触させることを特徴とする方法。

【請求項2】 金属表面を使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 チオールまたはジスルフィド基を含有する化合物を吸着結合試薬として使用する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 酸化金属表面を使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 シラン基を含有する化合物を吸着結合試薬として使用する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 吸着結合試薬が自己集合单層(self-assembled monolayer)の形態で配置される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 金属または酸化金属の層を実質的に連続的にコーティングした支持体を含んでなる固相マトリックスであって、該金属または酸化金属の層上に空間的に画定された試薬領域が配置されており、該試薬領域のそれぞれが、(a)異なる固相反応物を含有し、および/または、(b)異なる濃度の固相反応物を含有することを特徴とする固相マトリックス。

【請求項8】 被検体の結合および/または相互作用を検出する方法であって、請求項7に記載の固相マトリックスを使用し、該被検体の結合および/または相互作用を公知の方法で検出することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、空間的に画定された試薬領域または試薬スポットを、金属または酸化金属の表面を有する固相上に形成する方法、ならびに空間的に画定された試薬スポット中に種々の固相反応物および/または種々の濃度の固相反応物を含む固相結合マトリックスに関する。

【0002】

【従来の技術】 ガラスまたはプラスチック支持体などの種々の表面に少量の試薬を添加するのに使用できる方法は、多数知られている。そのような方法により、試薬の微細構造が、例えば、互いに空間的に分離した試薬スポットの形態として、表面上に得られる。この点に関して特に関心が持たれるのは、異なる官能性を各試薬スポットが有し、例えばDNA断片、抗体などの異なる反応物を個々の試薬スポットが含有する微細構造化表面(いわゆるアレイ(array))である。W092/10 092には、光反応性化合物の利用により及びマスクを使用する照射によりガラス支持体上に複数の異なる構造を形成させるのに

使用しうる方法が記載されている。米国特許第4,877,745号には、種々に官能化されたスポットをインクジェットによりプラスチック支持体に載置する方法が記載されている。

【0003】 プラスチックの表面とは異なり、金属および酸化金属の表面は、自己集合法により、厳密に画定されたマトリックス層をコーティングすることができるという利点を有する。例えば有機アルキルチオールを金の表面上に吸着させると、自己集合した单層(SAM)が形成される。そのような高密度に充填された单層の自発的組織化は、支持体材料と吸着剤との強力な特異的相互作用に基づくものである(Nuzzoら, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 4481)。このようにして、結合マトリックスの厳密に画定された单層を金属(例えば、金または銀)の表面に載置することが可能である。また、EP-A-0 515 615に記載のとおり、自己集合した固相の特異的結合能を、特異的な固相反応物の希釈により、さらに最適化することができる。

【0004】 自己集合した单層に基づく微細構造を金属表面にコーティングすることも公知である。例えば、Whitesidesら(Langmuir 10 (1994) 1498-1511)は、特別な微細構造化用シリコーンスタンプを使用して試薬を貴金属表面上にスタンプする方法を記載している。これにより、互いに空間的に分離した帯域を有する微細構造の单層を形成させることができる。しかしながら、そのようなスタンピング法では、得られる個々の帯域が、すべて等しく官能化されてしまう。すなわち、この方法では、アレイ構造の場合のように、個々のスポットを種々にコーティングして種々の官能性を得ることができない。

【0005】 さらに、全領域がチオールで被覆された基体のマスクを用いた照射と、それに続く洗浄により、自己集合した单層の微細構造を貴金属表面上に形成しうることが公知である(Hemmerlingら, Langmuir 10 (1994), 626-628)。また、すべて等しく官能化されている空間的に分離した帯域も、この方法で形成される。試薬スポットを得るさらに別の可能性としては、まず、互いに空間的に分離した金のスポットを支持体上に形成させ、ついで該スポットに試薬をコーティングすることが挙げられる。しかしながら、そのような空間的に分離した金スポットの製造には長時間を要し、該スポットを形成するには、マスクを用いて該基体を蒸着する必要がある。さらに、それに続いて、例えばマイクロピペットを用いて金スポットに試薬をコーティングするには、非常に精確な取り扱いを要し、μmの範囲の構造の場合には、そのような取り扱いは実現が非常に困難であり、技術的にきわめて煩雑である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 したがって、本発明の課題は、試薬スポットのアレイ構造を金属または酸化金

属の表面に簡便に形成することができる方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】この課題は、空間的に画定された試薬領域を固相に形成させる方法であって、吸着結合試薬を含有する液体と、実質的に連続的な金属または酸化金属の表面を含む空間的に画定された固相領域とを、該結合試薬と該固相との吸着結合の形成を可能にするのに十分な時間接触させることを特徴とする本発明の方法により達成される。

【0008】驚くべきことに、全体に金属または酸化金属を被覆した試薬支持体上に1つの溶液中の自己集合用試薬を直接スポットすることにより、当該分野の現技術水準が有する欠点を克服することができた。

【0009】

【発明の実施の形態】試薬スポットは、例えばインクジェット法により、あるいは自動マイクロピッティング装置を用いて形成させることができる。この方法では、試薬溶液を、小さな液滴の形態、好ましくは微小液滴の形態で表面にアプライする。試薬溶液をアプライした後、結合試薬と金属または酸化金属の表面との間で吸着結合の形成が可能となるよう、該表面を、ある程度の時間、例えば1~60分間、好ましくは5~10分間インキュベートする。インキュベーション時間は、使用する結合試薬および表面によって異なるが、吸着結合の形成を可能にするのに十分な長さとする。この方法では、自己集合した結合試薬単層を、金属または酸化金属の表面上に、空間的に画定された領域の形態で形成させる。隣り合う帯域同士の汚染(smearing)を防ぐために、インキュベーション後、該表面を大過剰の溶媒で迅速に洗浄する。使用する結合試薬に応じて、水性および/または有機溶媒を溶媒として使用することができる。

【0010】驚くべきことに、吸着的に結合する試薬を連続的な金属または酸化金属の層にアプライすることにより、空間的に画定された領域をスポットの形態で形成させることができあり、この場合、アプライしている間またはその後に、隣り合うスポットの有意な汚染が生じない。驚くべきことに吸着結合試薬が静止するため、表面と結合試薬との単なる吸着結合にもかかわらず、分離したスポットが形成される。この方法の重要な利点は、例えば免疫学的アッセイまたは核酸ハイブリダイゼーションアッセイなどの検出方法におけるマルチパラメーター(multiparameter)アッセイで使用しうる種々のコーティングまたは官能性を有する表面領域を形成させることができることである。さらに、自己集合の完了後に洗浄工程を行なえば、結合試薬が支持体上で他の試薬スポット中に持ち運ばれないことが判明した。さらに、個々の空間的に画定された帯域がまた、官能化された表面の製造後に安定であること、すなわち、吸着された結合試薬が、同じ部位に維持され、金属または酸化金属表

面の空いている部位へ移動しないことが判明した。

【0011】形成される試薬スポットの領域は、好ましくは5mm以下、さらに好ましくは1mm以下の直径を有する。試薬スポットは、最も好ましくはマイクロメートルの範囲で形成され、例えば50~500 μ mの直径を有する。これは、試薬溶液の滴下液体容量約0.1~10nlに相当する。空間的に明確に画定されたスポットが本発明方法により形成されるため、マイクロアレイ(microarray)構造を得ることが可能である。個々のスポット帯域のそれ10ぞれには、例えば免疫学的試験または核酸ハイブリダイゼーション試験のために、異なる反応物および/または異なる濃度の反応物をアプライすることができる。

【0012】表面は、好ましくは貴金属の表面、特に好ましくは金または銀の表面、最も好ましくは金の表面である。そのような金属表面は、例えば、薄い金属層を支持体(例えばガラス支持体)上に蒸着することにより形成させることができる。そのような蒸着層の厚さは、好ましくは10~100nmである。貴金属表面を用いる場合には、SHまたはSS試薬が吸着結合試薬として好ましく使用20される。そのようなチオールおよびジスルフィド試薬は、例えばDE 40 39 677に詳細に記載されている。チオールまたはジスルフィド基を含有する化合物が、特異的に結合可能な基(例えば、抗原、ハプテンまたはビオチン基)をさらに含有する吸着結合試薬として特に好ましく使用される。SAMとして表面に吸着されたビオチン化チオール試薬を、ついでストレプトアビジンでコーティングする。この場合、スポット中のビオチン含量がスポットごとに異なれば、異なるストレプトアビジン層が得られる。

【0013】一方、酸化金属を表面として使用することも可能である。適当な酸化金属の表面としては、例えば、 SiO_2 、 TiO_2 、 Al_2O_3 、 Sn_2O_3 、 Ag_2O 、 La_2O_3 、 Ta_2O_5 、およびそれらの混合物が挙げられる。 SiO_2 および/または TiO_2 よりなる酸化金属の表面が好ましく使用される。酸化金属の表面を使用する場合には、シラン基を含有する化合物が吸着結合試薬として好ましく使用される。そのような化合物は、例えばEP-A-0 664 452に記載されている。シラン基を含有する化合物を酸化金属表面に吸着させる場合には、例えば加熱することにより共有結合性40の架橋が吸着後に生じる。

【0014】本発明で使用する吸着結合試薬は、好ましくは、それぞれの吸着基(例えば、SH、SSまたはシラン基)の他に、特異的に結合可能な少なくとも1つの基(例えば、測定すべき被検体などの結合相手と特異的に結合するビオチン、ビオチン誘導体、ストレプトアビジン、ハプテン、抗原および/または核酸配列)を含有する。本発明の官能化された固相マトリックスへの被検体の結合は、例えば、同焦点スキャナー蛍光顕微鏡検査またはプラズモン共鳴分光法により検出することができる。該検出は、好ましくは、プラズモン共鳴顕微鏡検査50

(B. Ruthenhauslerら, *Nature*, vol. 332 (1988) 615-617) により行なう。被検体の結合は、表面プラズモン共鳴により、標識試薬を使用することなく検出することができる。特に好ましくは、被検体の結合を検出するために、プラズモン共鳴と蛍光検出とを同時に測定する。この場合、プラズモン共鳴シグナルおよび蛍光シグナルは互いに独立して得られるため、高い感度 (10^{-14} mol/l) が得られることに加えて、反応速度論の測定も可能となる。

【0015】本発明のもう1つの主題は、金属または酸化金属の層を実質的に連続的にコーティングした支持体を含んでなる固相マトリックスであって、該金属または酸化金属の層上に、空間的に画定された試薬領域が配置され、該試薬領域が、(a) 異なる固相反応物を含有し、および/または、(b) 異なる濃度の固相反応物を含有することを特徴とする固相マトリックスである。そのような固相結合マトリックスは、好ましくは、少なくとも3つの異なって官能化された帯域、特に好ましくは、少なくとも5つの異なって官能化された帯域を表面上に含む。試薬スポットの直径は、好ましくは5mm以下、より好ましくは1mm以下、最も好ましくは500μm以下である。μmの範囲の試薬スポットを有するそのような固相マトリックスはマイクロアレイと称されることもある。

【0016】本発明のもう1つの主題は、本発明の固相マトリックスを使用して被検体の結合および/または相互作用を検出する方法である。プラズモン共鳴分光法および/またはプラズモン共鳴顕微鏡検査を検出方法として用いる場合には、層の厚さが測定可能であるためリアルタイムの検出が可能であり、また、標識は不要である。かかる方法は、アレルギーを判定するための分子診断学、免疫学においておよび核酸ハイブリダイゼーションに用いることができる。被検体の結合および/または相互作用を検出するためには、プラズモン共鳴分光法と蛍光検出との組合せ又はプラズモン共鳴顕微鏡検査と蛍光検出との組合せが特に好ましく用いられる。

【0017】

【実施例】つぎに、実施例および添付図面により本発明をさらに詳しく説明する。

【0018】実施例1

表面での試薬スポットの形成

本発明の方法の原理を、好ましい実施態様について図1を参照して説明する。まず、高真空コーティング装置 (Leibold Co.) を用いて、LASFN9高屈折率ガラスよりなるガラス支持体上に約50nmの厚さの金の層を高真空 (約 10^{-7} mbar) 中で蒸着させた。その金層の蒸着直後に、シリコン圧力ポンプ (GeSIM, Dresden) (4) を装備したXYZテーブル (Iisel-EP 1090/4) (2) 上に支持体 (10) を固定した。また、XYZテーブル (2) の作業面に、マイクロタイタープレート (6) を取付けた。該

マイクロタイタープレートは、それぞれの異なるウェル中に、溶媒に溶解された種々の吸着結合試薬および純粋な溶媒を含有する。吸着用の物質として、HS-Prop-DAD00-X-ビオチン (結合可能な試薬) (図2a) およびHS-C2-アミノエトキシエタノール (希釀剤成分) (図2b) よりなる水溶性チオール系を 5×10^{-4} モルの濃度で水に溶解し、HS-C12-DAD00-ビオチン (結合可能なビオチン成分) (図2c) およびメルカプトウンデカノール (希釀剤成分) (図2d) よりなるエタノールに可溶性のチオール系を 5×10^{-4} モルの濃度でエタノールに溶解した。これらの系を、マイクロタイタープレートの別々のウェルに、異なる混合比 (ビオチン成分の比率が0%、10%、50%および100%) で入れた。試薬スポットを金表面に形成させるために、今度はポンプ (4) の先端を、対応する液体に浸し、ついで、金をコーティングした表面上の予定の位置へ移動させ、その位置に約1nlの容量の液滴 (8) を載置した。ついでポンプを純粋な溶媒で2回洗浄し、この工程を次の溶液で繰返し、前のスポットから約600μm離れた位置に次のスポットを載置した。この工程は、必要に応じて何回も繰返すことができる。

【0019】ついで、試薬スポットを載置した金表面を約10分間固化させた。その間に、自己集合した单層が、該液滴で覆われた表面上に形成された。ついで、未吸着分子を洗い落とすために、金表面の全域を純粋な溶媒で洗浄した。このようにして、空間的に画定された反応スポットを有する表面を短時間で製造することが可能である。スポットの直径は約200μmであった。

【0020】実施例2

金表面に形成された試薬スポットのプラズモン顕微鏡検査

作製されたビオチン单層の光学的厚さを測定し、ストレプトアビシンに対する結合特性を調べるために、試薬スポットを有する金表面を、表面プラズモン顕微鏡検査によりKretschmannコンフィグレーション (プリズムと組合せた) で調べた。この方法では、図3に示すとおり、偏光板 (12) によりp偏光され広げられたレーザー光 (赤色He-Neレーザー) (14) が、高屈折ガラスよりなるプリズム (16) を金属層 (18) に対して特定の入射角で通ることにより、表面プラズモンが励起された。入射角に応じて、反射光がCCDカメラ (20) により記録された。さらに、図3に示す構造は、ゴニオメーター (30)、および顕微鏡オプチックスを構成する2つのレンズ (28, 32) を含んでいた。記録された写真上の明暗のコントラストは、試薬スポット上の層の厚さによって異なる。コンピューターを含む画像分析系 (22) を用いて、層の厚さの絶対的増加およびその時間経過を約0.1nmの精度で測定することが可能である。図4および5は、ストレプトアビシンの結合の前および後にチオールでコーティングしたスポットの、CCDカメラを用いて得られた写真を示す。図6は、種々にコーティングされた

スポットに対するストレプトアビジンの結合の画像分析により得られた強度の時間経過を示す。図4には6枚の写真が示されているが、それらのそれぞれは、レーザー光の入射角が異なる場合の等しく官能化された12個のチオールスポットを示す。16個の試薬スポットを有するコーティングされた支持体を図5に示すが、この場合、1組4個の各スポットは等しく官能化されており、左側の写真はストレプトアビジンの結合前に撮影したものであり、右側の写真はストレプトアビジンの結合後に撮影したものである。これらから明らかなどおり、本発明の方法によれば、空間的に分離した種々に官能化された試薬スポットを連続表面に形成させることができる。

【0021】図6は、プラズモン共鳴顕微鏡検査の反射強度を分析することにより得られた、異なる4つの親水性チオール混合物をコーティングした表面へのストレプトアビジンの吸着の時間経過を示す。K1は、純粋な溶媒溶液と共にインキュベートした試薬スポットを表す。ついで、このスポットをストレプトアビジンで処理した。図6に示すとおり、試薬スポットに対するストレプトアビジンの結合は非常にわずかなものにすぎない。K2は、1%のビオチン化チオールおよび99%の希釀剤チオールよりなる溶液と共にインキュベートし、ついでストレプトアビジンで処理した試薬スポットを表す。曲線K1より相当に高いストレプトアビジン結合を認めることができる。K3は、100%のビオチン化チオールと共に（すなわち、希釀剤分子なしで）インキュベートし、ついでストレプトアビジンで処理した試薬スポットを表す。層の厚さが、K2では $22 \pm 3 \text{ \AA}$ であったのに対して、K3では $33 \pm 3 \text{ \AA}$ と、かなり増加していた。最後に、K4は、10%のビオチン化チオールおよび90%の希釀剤分子で処理した試薬スポットを表す。この場合、希釀された均一な結合層が形成されるが、これはストレプトアビジン処理の後に最高の反射を示し、層の厚さは $43 \pm 3 \text{ オングストローム}$ と算出された。図6に示すとおり、種々のコーティングを*

* 有する試薬スポットを単一の平らな金支持体に形成させることができ、それにより、アレイ系が形成される。さらに、そのようなアレイを使用して被検体の結合および/または相互作用を検出することが可能であり、この場合、層の厚さ（コーティング量）および反応速度論（吸着速度）を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】試薬スポットの形成の原理を示した図である。

【図2】自己集合した単層の形成に適した試薬を示した図である。

【図3】表面プラズモン顕微鏡の試験的構造を示した図である。

【図4】本発明に従って金表面上に形成させた試薬スポットの、プラズモン顕微鏡を用いて得られた結果を示した図である。

【図5】本発明に従って金表面上に形成させた試薬スポットの、プラズモン顕微鏡を用いて得られた結果を示した図である。

【図6】表面プラズモン顕微鏡検査で得られた、異なる4つの親水性チオール混合物を有するマトリックスの時間依存的反射強度を時間に対して示した図である。

【符号の説明】

2 XYZテーブル

4 ポンプ

6 マイクロタイタープレート

8 液滴

10 支持体

12 偏光板

16 プリズム

18 金属層

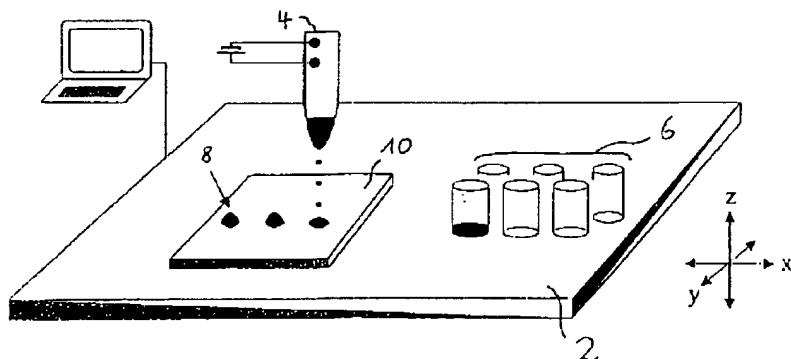
20 CCDカメラ

22 画像分析系

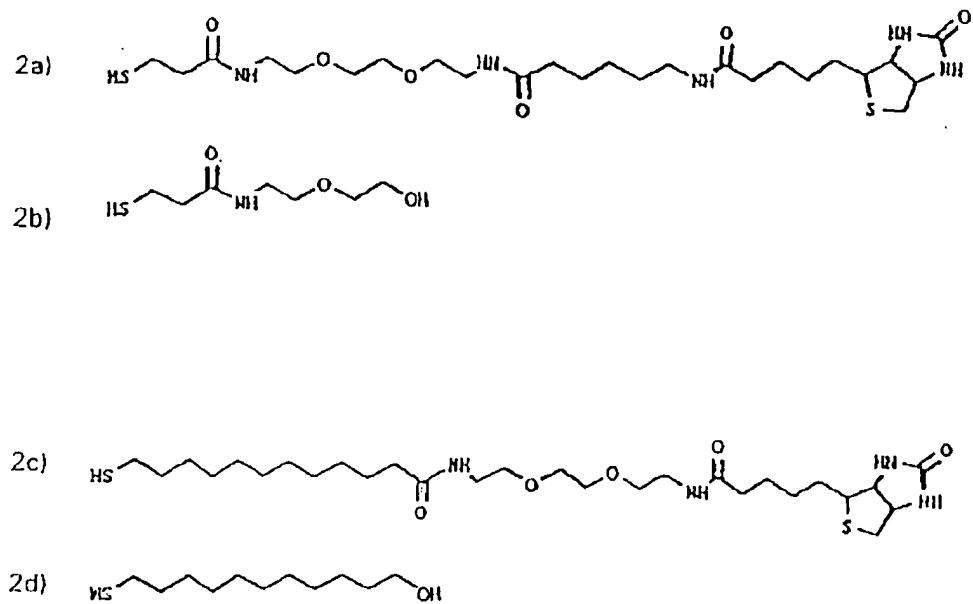
28、32 レンズ

30 ゴニオメーター

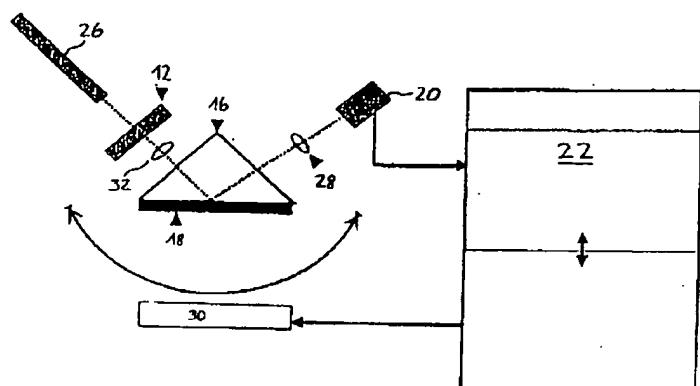
【図1】



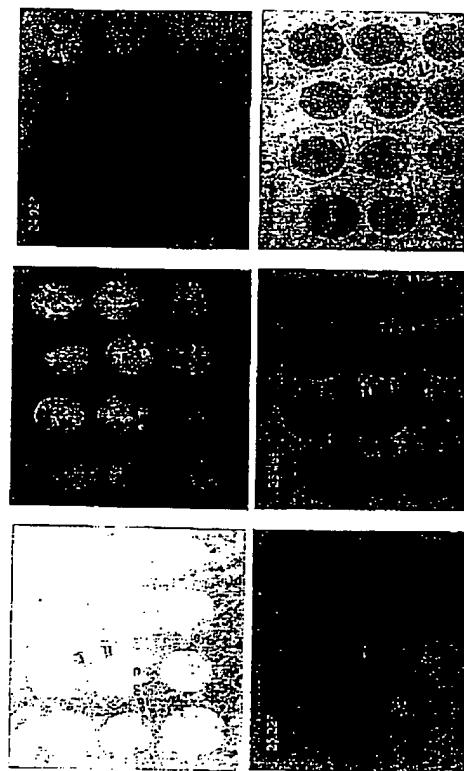
【図2】



【図3】



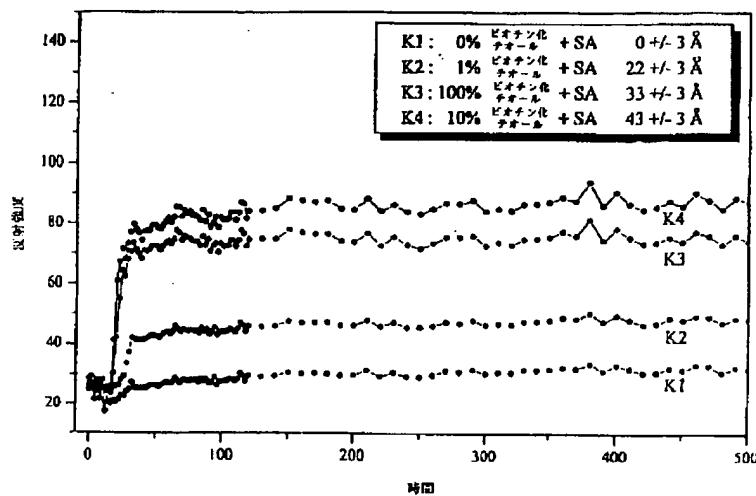
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 マンフレッド ジルスパーガー
ドイツ連邦共和国 ディーー55126 マイ
ンツ, ボーンガッセ 15